

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/73432 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/543,  
33/538, B01L 3/00

GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN  
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, 91056 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01078

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. März 2001 (17.03.2001)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSAK, Hans  
[DE/DE]; Von-Witzleben-Strasse 23, 53123 Bonn (DE).  
KRAUSE, Jürgen [DE/DE]; Mozartstrasse 71, 91052  
Erlangen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A,  
91052 Erlangen (DE).

(30) Angaben zur Priorität:  
100 15 448.4 29. März 2000 (29.03.2000) DE

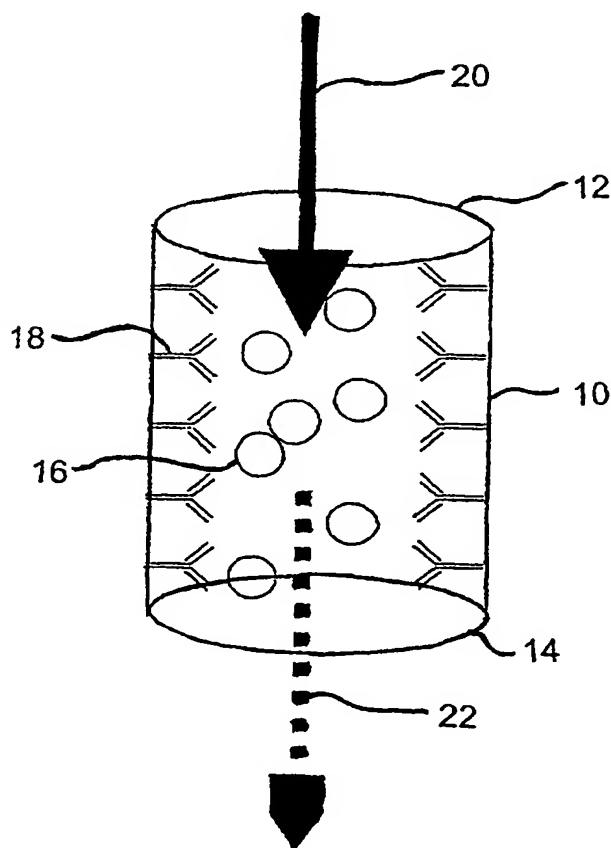
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AND/OR QUANTIFYING FIRST MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEISEN UND/ODER QUANTIFIZIEREN ERSTER MOLEKÜLE



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and/or quantifying the binding of first molecules (16) to second molecules (18) affine thereto. The inventive method comprises the following steps: a) providing a container (10), wherein the second molecules (18) are immobilised on a wall, b) contacting the second molecules (18) to a solution containing the first molecules (16), c) incubating the container (10) in such a way that the first molecules (16) bind to the second molecules (18) and build up on the wall and d) detecting the changes in concentration of the first molecules (16) in the solution by means of radiation without removing the solution from the container (10), whereby the solution is contained in said container (10).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des Bindens erster Moleküle (16) an dazu affine zweite Moleküle (18) mit folgenden Schritten: (a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle 18 an einer Wand immobilisiert sind, (b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung, (c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) an die zweiten Moleküle (18) binden und sich an der Wand anreichern und (d) Detektieren der Konzentrationsänderung der ersten Moleküle (16) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne die Lösung aus dem Gefäß (10) zu entnehmen.

WO 01/73432 A3



LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts:**

11. April 2002

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/DE 01/01078

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/543 G01N33/538 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 32886 A (VICAM LP) 1 July 1999 (1999-07-01) abstract; examples ----	1-5
A	EP 0 942 283 A (THACO RESEARCH LTD) 15 September 1999 (1999-09-15) the whole document ----	1-5
A	US 5 045 479 A (NEWMAN ARNOLD L ET AL) 3 September 1991 (1991-09-03) abstract; examples ----	1-5
A	EP 0 520 202 A (DRAEGERWERK AG) 30 December 1992 (1992-12-30) abstract; examples ----- -/-	1-5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 October 2001

Date of mailing of the international search report

09/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PLI/DE 01/01078

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DE 195 00 862 A (ABION OHG)  20 July 1995 (1995-07-20)  the whole document</p> <p>-----</p>	1-5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/01078

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9932886	A	01-07-1999	AU 1944699 A WO 9932886 A1	12-07-1999 01-07-1999
EP 0942283	A	15-09-1999	EP 0942283 A2	15-09-1999
US 5045479	A	03-09-1991	NONE	
EP 0520202	A	30-12-1992	DE 4121493 A1 EP 0520202 A2	07-01-1993 30-12-1992
DE 19500862	A	20-07-1995	WO 9519569 A1 AU 5882994 A DE 19500862 A1 EP 0739487 A1 JP 9507577 T	20-07-1995 01-08-1995 20-07-1995 30-10-1996 29-07-1997

PLI/DE 01/01078

Seite 1 von 2



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 00 862 A (ABION OHG) 20. Juli 1995 (1995-07-20) das ganze Dokument -----	1-5

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01078

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9932886 A	01-07-1999	AU 1944699 A WO 9932886 A1	12-07-1999 01-07-1999
EP 0942283 A	15-09-1999	EP 0942283 A2	15-09-1999
US 5045479 A	03-09-1991	KEINE	
EP 0520202 A	30-12-1992	DE 4121493 A1 EP 0520202 A2	07-01-1993 30-12-1992
DE 19500862 A	20-07-1995	WO 9519569 A1 AU 5882994 A DE 19500862 A1 EP 0739487 A1 JP 9507577 T	20-07-1995 01-08-1995 20-07-1995 30-10-1996 29-07-1997

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/73432 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01078

(22) Internationales Anmeldedatum:  
17. März 2001 (17.03.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 15 448.4 29. März 2000 (29.03.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT

GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN  
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, 91056 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSAK, Hans  
[DE/DE]; Von-Witzleben-Strasse 23, 53123 Bonn (DE).  
KRAUSE, Jürgen [DE/DE]; Mozartstrasse 71, 91052  
Erlangen (DE).

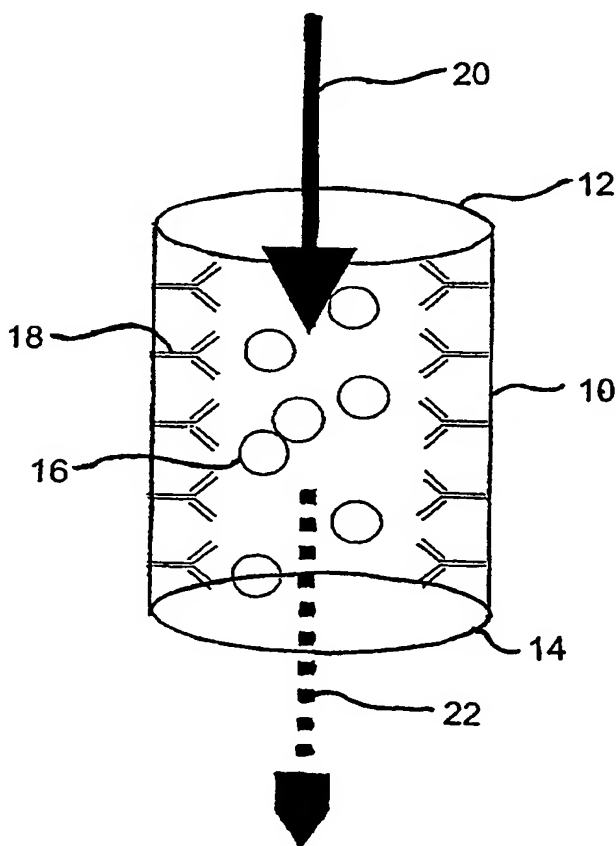
(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A,  
91052 Erlangen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AND/OR QUANTIFYING FIRST MOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEISEN UND/ODER QUANTIFIZIEREN ERSTER MOLEKÜLE



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and/or quantifying the binding of first molecules (16) to second molecules (18) affine thereto. The inventive method comprises the following steps: a) providing a container (10), wherein the second molecules (18) are immobilised on a wall, b) contacting the second molecules (18) to a solution containing the first molecules (16). c) incubating the container (10) in such a way that the first molecules (16) bind to the second molecules (18) and build up on the wall and d) detecting the changes in concentration of the first molecules (16) in the solution by means of radiation without removing the solution from the container (10), whereby the solution is contained in said container (10).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des Bindens erster Moleküle (16) an dazu affine zweite Moleküle (18) mit folgenden Schritten: (a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle 18 an einer Wand immobilisiert sind, (b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung, (c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) an die zweiten Moleküle (18) binden und sich an der Wand anreichern und (d) Detektieren der Konzentrationsänderung der ersten Moleküle (16) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne die Lösung aus dem Gefäß (10) zu entnehmen.



WO 01/73432 A2



LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren erster Moleküle**

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweisen und/oder  
5 Quantifizieren des Bindens erster Moleküle an dazu affine  
zweite Moleküle. Sie betrifft ferner Verfahren zum Nachweisen  
und/oder Quantifizieren der enzymatischen oder chemischen Ak-  
tivität erster Moleküle zu dazu affinen zweiten oder dritten  
Molekülen. Die Erfindung betrifft außerdem eine Mikrotiter-  
10 platte zur Durchführung des Verfahrens und eine Verwendung.

Bekannt sind Verfahren mit folgenden Schritten:

- 15 A) Inkontaktbringen von eine Markierungssubstanz aufweisen-  
den ersten Molekülen mit dazu affinen, immobilisierten  
zweiten Molekülen in einem Bindungsansatz,
- B) Inkubieren des Bindungsansatzes,
- 20 C) Detektieren einer Eigenschaft der Markierungssubstanz an  
denjenigen ersten Molekülen, die an zweite Moleküle ge-  
bundenen sind.

Für Verfahren mit hohem Probendurchsatz (High-Throughput-  
25 Screening) ist es günstig Schritt lit. C durchzuführen, ohne  
ungebundene erste Moleküle aus dem Bindungsansatz zu entfer-  
nen. Folgende Verfahren ohne Entfernung der ersten Moleküle  
sind bekannt:

- 30 - Detektieren einer Fluoreszenz-Polarisation. Die Markie-  
rungssubstanz ist ein Fluorophor. Gemessen wird die Änderung  
der Fluoreszenz-Polarisation der Markierungssubstanz durch  
das Binden.

- Detektieren einer durch einen Energie-Transfer bedingten Änderung einer Fluoreszenz. Die Markierungssubstanz ist entweder ein Fluoreszenz-Donor oder ein Fluoreszenz-Akzeptor. Durch das Binden verringert sich der Abstand der ersten Moleküle zu den zweiten Molekülen. Das ermöglicht einen Energie-Transfer zwischen der Markierungssubstanz und einem weiteren, in der Nähe der zweiten Moleküle angeordneten Fluoreszenz-Akzeptor bzw. Fluoreszenz-Donor.
- 10 - Detektieren einer Änderung der Verweildauer der ersten Moleküle in einem vorgegebenen Volumen. Bei diesem auch als Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bekannten Verfahren ist die Markierungssubstanz ein Fluorophor. Die Geschwindigkeit der Molekularbewegung der ersten Moleküle verringert sich durch die Bindung an die zweiten Moleküle. Die Verweildauer des Fluorophors in dem vorgegebenen Volumen erhöht sich.
- 20 Darüber hinaus gibt es Testsysteme, bei denen das Binden unmarkierter erster Moleküle an zweite Moleküle indirekt detektiert wird:
- Die zweiten Moleküle sind an Mikropartikeln immobilisiert. An den zweiten Molekülen sind fluoreszierende dritte Moleküle spezifisch gebunden. Das Binden der ersten Moleküle an die zweiten Moleküle verdrängt die gebundenen dritten Moleküle von den Bindungsstellen. Die dadurch bedingte Änderung der Fluoreszenz der Mikropartikel wird detektiert.
- 30 - Die zweiten Moleküle sind an einer Gefäßwand immobilisiert, die einen Szintillator enthält. An die zweiten Moleküle sind dritte Moleküle spezifisch gebunden, die eine radioaktive Markierungssubstanz aufweisen. Die Markierungssubstanz

verursacht eine meßbare Szintillation. Das Binden der ersten Moleküle an die zweiten Moleküle verdrängt die gebundenen dritten Moleküle von den Bindungsstellen. Die dadurch bedingte Änderung der Szintillation wird gemessen.

5

Die bekannten homogenen Testsysteme sind technisch aufwendig und benötigen zum Teil gesundheitsgefährdende Substanzen.

Die WO 95/18376 beschreibt ein Verfahren zur Ermittlung der Konzentration eines Analyten in einer Flüssigkeit. Dabei wird die Flüssigkeit mit einer an einer festen Phase immobilisierten Sonde in Kontakt gebracht, welche den Analyten spezifisch bindet. Anschließend wird der Anteil der belegten und der nicht belegten Bindungsstellen der Sonde mittels Rücktitration bestimmt. Das Ergebnis wird mit einem zuvor ermittelten Standart verglichen. - Das verwendete Verfahren erfordert viele Schritte. Es ist zeitaufwendig und anfällig gegenüber Verunreinigungen.

Die US 6,020,207 offenbart ein Verfahren zur optischen Detektion chemischer Verbindungen. Dabei ist eine Sonde an der Innenwand einer Kapillare immobilisiert. Eine den Analyten enthaltende Lösung wird in die Kapillare gefüllt. Zur Detektion der chemischen Verbindung wird die durch die Bindung der chemischen Verbindung an die Sonde bewirkte geänderte Lichtabsorption an der Innenwand der Kapillare gemessen. - Die Messung ist kompliziert und erfordert einen hohen apparativen Aufwand.

Die WO 99/44065 beschreibt ein Verfahren zur Detektion eines Analyten in einer Probe. Dabei wird die den Analyt enthaltene Lösung durch eine Kapillare gepumpt, an deren Innenwand eine Sonde immobilisiert ist. An die Sonde sind Verbindungen ge-

bunden, welche eine mittels modifizierter Raman-Spektroskopie erfaßbare Markierung aufweisen. Bei Vorliegen des Analyten werden die Verbindungen freigesetzt und können mittels modifizierter Raman-Spektroskopie nachgewiesen werden.

5

Die DE 44 07 142 A1 betrifft einen heterologen Immonoassay, bei dem eine Sonde auf einem festen Träger, z.B. einer Durchflußküvette, immobilisiert ist. Ein in einer Lösung enthaltener Analyt wird an die Sonde gebunden, anschließend wieder  
10 gelöst und z.B. mittels Fluoreszenz oder UV-Absorption nachgewiesen.

Die DE 198 28 837 A1 beschreibt ein Verfahren, bei dem eine Sonde an einem Ring immobilisiert ist. Zum Nachweis von an  
15 die Sonde gebundenem Analyt kann der Ring in eine Reaktionskammer eines UV-Analysengeräts eingespannt werden. Das vorgeschlagene Nachweisverfahren ist aufwendig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile des  
20 Stands der Technik zu beseitigen. Insbesondere sollen Verfahren, eine Mikrotiterplatte und eine Verwendung bereitgestellt werden, mit denen einfach und kostengünstig ein hoher Proben-  
durchsatz erzielbar ist. Nach dem Inkontaktbringen der zweiten Moleküle mit den ersten Molekülen soll kein weiterer Pi-  
25 pettier- oder Waschschrift erforderlich sein.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 bis 5,  
34 und 40 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich  
aus den Merkmalen der Ansprüche 5 bis 33, 35 bis 39 sowie 41  
30 und 42.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zum Nachweis und/oder Quantifizieren des Bindens erster Moleküle an dazu



affine zweite Moleküle. Es eignet sich ebenso zum Quantifizieren der enzymatischen oder chemischen Aktivität erster Molekülen zu dazu affinen zweiten oder dritten Molekülen. Die Verfahrensschritte lit. a bis d ermöglichen jeweils eine einfache, schnelle und kostengünstige Verfahrensführung.

Das Detektieren der Konzentration beim Schritt lit. d kann mittels elektromagnetischer Strahlung, wie Licht, oder mittels Teilchenstrahlung, wie Neutronenstrahlung, erfolgen. Es findet im Gefäß vorzugsweise in einem Bereich statt, der möglichst weit von der Wand entfernt ist. Das erhöht die Genauigkeit des Verfahrens. Die erfindungsgemäßen Verfahren haben den Vorteil, mit einem geringen Pipettieraufwand durchführbar zu sein. Sie sind einfach zu handhaben und kostengünstig. Sie erfordern einen geringen Bedarf an Material und Raum. Sie ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und sind gut zur Automatisierung geeignet. Das wird insbesondere dadurch erreicht, daß nach dem Inkontaktbringen der zweiten Moleküle mit einer die ersten Moleküle enthaltenden Lösung keine weiteren mechanischen Arbeitsschritte, insbesondere keine Trenn- und Waschschr

10  
15  
20  
25

Bei den Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des Bindens (= Verfahrensgruppe I) unter Verwendung dritter oder vierter Molekülen ist es besonders vorteilhaft, wenn diese mit den zweiten Molekülen oder der Wand assoziiert sind. Auf

30

diese Art und Weise ist es nicht erforderlich die dritten oder vierten Moleküle in einem Pipettierschritt der Lösung oder dem Gefäß hinzuzufügen.

- 5 Weiterhin ist es bei den Verfahren gemäß Verfahrensgruppe I mit vierten Molekülen vorteilhaft, wenn die Affinität der vierten Moleküle zu den zweiten Molekülen nicht oder nicht wesentlich größer ist als die Affinität der ersten Moleküle zu den zweiten Molekülen. Das erleichtert das Verdrängen der  
10 vierten Moleküle von deren Bindungsstellen an den zweiten Molekülen. Auch die Bindung der vierten Moleküle an die zweiten Moleküle wird leichter verhindert.

- Vorteilhafterweise ist bei den Verfahren gemäß Verfahrens-  
15 gruppe I mit vierten Molekülen die Anzahl der ersten Moleküle größer als die Anzahl der zweiten Moleküle und die Anzahl der zweiten Moleküle ist größer als die Anzahl der vierten Moleküle. Das bewirkt eine Kompetition der ersten Moleküle und der vierten Moleküle um die Bindungsstellen an den zweiten  
20 Molekülen. Die Konzentration der vierten Moleküle wird stark durch die Konzentration der ersten Moleküle und deren Affinität zu den zweiten Molekülen beeinflusst.

- Bei einem Verfahren der Verfahrensgruppe I ohne vierte Moleküle ist es bevorzugt, daß die Anzahl der zweiten Moleküle  
25 größer ist als die Anzahl der ersten Moleküle. Das führt zu einer schnellen und deutlichen Konzentrationsänderung der ersten Moleküle oder der ersten und dritten Moleküle in der im Gefäß enthaltenen Lösung. Bei einem Verfahren mit dritten Molekülen ist es vorteilhaft, wenn die Anzahl der ersten Moleküle nicht kleiner ist als die Anzahl der dritten Moleküle.  
30 Das verhindert, daß nach der Bindung der ersten Moleküle an die zweiten Moleküle in der Lösung dritte Moleküle verblei-

ben. In der Lösung verbleibende dritte Moleküle bewirken bei Schritt lit. d ein Hintergrundsignal.

Bei den Verfahren zum Nachweis und/oder Quantifizierung der enzymatischen oder chemischen Aktivität erster Moleküle (= Verfahrensgruppe II) kann das erste Molekül ein spaltendes Enzym, vorzugsweise eine Protease, eine Peptidase, Nuklease, Helicase oder Lipase, oder ein Zucker-abbauendes Enzym sein. Das zweite Molekül kann ein, vorzugsweise aus einem Protein, Peptid, einer Nukleinsäure, Helicase oder einem monomeren oder polymeren Zucker gebildetes, Substrat für das erste Molekül bilden. Es ist ferner möglich, daß das dritte Molekül ein spaltendes Enzym, vorzugsweise eine Protease, Peptidase, Nuklease, Helicase oder Lipase oder ein Zucker-abbauendes Enzym ist. Das zweite Molekül bildet zweckmäßigerweise ein, vorzugsweise aus einem Protein, Peptid, einer Nukleinsäure, Helicase oder einem monomeren oder polymeren Zucker gebildetes, Substrat für das dritte Molekül. Das erste Molekül kann in Bezug zum dritten Molekül ein Agonist, ein Antagonist oder ein Kompetitor sein. Ferner ist es zweckmäßig, daß durch die Bindung des zweiten Moleküls an das erste Molekül eine Spaltung des zweiten Moleküls durch das dritte Molekül verhindert wird.

Bei einer vorteilhaften auf beide Verfahrensgruppen gleichermaßen anwendbaren Ausgestaltung wird zum Detektieren mit einem Lichtstrahl, insbesondere einer definierten Wellenlänge, vorzugsweise einem Laserstrahl, in die Lösung eingestrahlt. Der Lichtstrahl kann parallel zu der Wand eingestrahlt werden. Er kann polarisiert sein. Zum Detektieren kann eine Fluoreszenz, eine Streuung eine Absorption oder eine optische Aktivität gemessen werden.

Vorteilhafterweise enthält die Lösung zusätzlich fünfte, als interne Marker dienende Moleküle, die keine spezifische Affinität zu den ersten, zweiten, dritten oder vierten Molekülen aufweisen. Die fünften Moleküle können dazu eingesetzt werden, eine Volumen- und damit eine Konzentrationsänderung durch Verdunsten von Wasser festzustellen. Weiterhin können die fünften Moleküle dazu dienen, das Maß unspezifischer Bindungen zu ermitteln. Dabei zeigt eine Abnahme der Konzentration der fünften Moleküle eine unspezifische Bindung an die Wand und/oder die zweiten Moleküle an.

In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel sind die ersten, dritten, vierten und/oder fünften Moleküle oder damit assoziierende Bestandteile der Lösung fluoreszierend, lichtstreuend, lichtabsorbierend oder optisch aktiv. Damit assoziierte Bestandteile der Lösung können beispielsweise Antikörper sein, welche die ersten, dritten, vierten und/oder fünften Moleküle spezifische binden können.

Vorteilhafterweise erfolgt die Durchführung des Schritts lit. d durch mehrfaches oder kontinuierliches Bestimmen der Konzentration der ersten, dritten oder vierten Moleküle während der Durchführung des Schritts lit. c, insbesondere an deren Beginn und Ende. Das Bestimmen der Konzentration kann beispielsweise durch Vergleichen der optischen Eigenschaften der Lösung mit denjenigen verschiedener Eichlösungen erfolgen.

Bevorzugt sind freie Bindungsstellen an der Wand des Gefäßes durch daran gebundene sechste Moleküle abgesättigt. Die sechsten Moleküle sollten ähnliche physikalisch/chemische Eigenschaften, wie Ladung, Molekülgröße usw., aufweisen, wie die zweiten Moleküle. Sie sollten jedoch keine Affinität zu den ersten Molekülen besitzen. Dadurch kann eine unspezifische

Bindung an freie Bindungsstellen an der Wand des Gefäßes unterdrückt werden. Unspezifisch ist jede Bindung, die nicht an den spezifischen Bindungsstellen der zweiten Moleküle erfolgt.

5

Vorteilhafterweise enthält die Lösung mindestens einen eine unspezifische Bindung inhibierenden Zusatz, insbesondere ein Detergenz, ein Protein, ein Proteingemisch oder ein Salz. Der Zusatz unterdrückt nicht die spezifische Bindung der ersten Moleküle an den spezifischen Bindungsstellen der zweiten Moleküle. Er inhibiert unspezifische Bindungen der ersten, zweiten, dritten, vierten und fünften Moleküle untereinander und an der Wand des Gefäßes bzw. den dort gebundenen sechsten Molekülen. Als Detergenzien kommen z.B. Tween-20, Nonidet oder SDS in Betracht. Als Salze sind solche geeignet, die unspezifische Ionenbindungen unterdrücken. Proteine oder Proteingemische können z.B. Magermilch, Rinderserumalbumin oder Casein sein.

20

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung wird zur Ermittlung einer spezifischen Konzentrationsänderung von dem Betrag der Konzentrationsänderung gemäß Schritt lit. d der Betrag einer Konzentrationsänderung bei Durchführung des Verfahrens ohne zweite Moleküle abgezogen. Spezifisch ist eine Konzentrationsänderung, die nur durch eine Bindung der ersten Moleküle an die zweiten Moleküle verursacht wird.

Bevorzugt sind die zweiten Moleküle an einer vorgegebenen Stelle ihrer Struktur immobilisiert. Das ermöglicht es, ein Immobilisieren der zweiten Moleküle an derjenigen Stelle ihrer Struktur zu vermeiden, die affin zu den zweiten bzw. vierten Molekülen ist. Ein solches Immobilisieren würde die

30

Zugänglichkeit dieser Stellen für dazu affine erste bzw. vierte Moleküle einschränken. Vorteilhafterweise sind die zweiten Moleküle über Linker oder Spacer an der Wand gebunden. Das verbessert die Zugänglichkeit der zweiten Moleküle.

5 Linker können das Immobilisieren von zweiten Molekülen, die sich direkt nur schlecht oder gar nicht immobilisieren lassen, verbessern oder ermöglichen.

Vorzugsweise ist das Gefäß als Kavität einer Mikrotiterplatte mit mindestens 96, insbesondere 384, Kavitäten ausgebildet. Bei einer bevorzugten Ausgestaltung weist das Gefäß an der Ein- und/oder Austrittsstelle des Lichtstrahls, vorzugsweise dem Boden des Gefäßes, im wesentlichen keine immobilisierten zweiten Moleküle auf. Das verhindert beim Schritt lit. d eine

15 Störung des Detektierens durch erste, dritte oder vierte Moleküle, die direkt oder indirekt an immobilisierte zweite Moleküle an der Ein- und/oder Austrittsstelle des Lichtstrahls gebunden sind. Besonders vorteilhaft ist es, wenn das Gefäß eine an den Enden offene Kapillare ist. Unter einer Kapillare

20 wird hier ein an beiden Seiten offenes Röhrchen mit einem Innendurchmesser von bis zu 2 Millimeter verstanden. Die Kapillare kann von dem Lichtstrahl so durchstrahlt werden, daß dieser die Wand der Kapillare nicht bestrahlt. Eine Beeinflussung des Detektierens durch gebundene erste, dritte oder

25 vierte Moleküle ist ausgeschlossen. Vorzugsweise wird die Kapillare mittels Kapillarkräften mit der Lösung gefüllt. Dadurch ist die Aufnahme eines definierten Volumens gewährleistet. Ein Pipettierschritt ist nicht erforderlich. Eine dadurch bedingte Fehlerquelle ist ausgeschlossen.

30 Bevorzugt ist der Quotient aus der Fläche der Wand in  $\text{mm}^2$  und dem Volumen der Lösung in  $\text{mm}^3$  größer als  $1 \text{ mm}^{-1}$ , vorzugsweise größer als  $3 \text{ mm}^{-1}$ . Das Gefäß ist in diesem Fall länglich. Ein

vorgegebenes Volumen kann mit einer großen Wandfläche mit immobilisierten zweiten Molekülen in Kontakt gebracht werden. Gleichzeitig ist ein langer Weg des Lichtstrahls durch die Lösung gewährleistet. Die Empfindlichkeit des Verfahrens kann  
5 durch eine längliche Geometrie des Gefäßes erheblich gesteigert werden.

Die ersten, zweiten, dritten, vierten, fünften oder sechsten Moleküle können aus folgender Gruppe ausgewählt sein: Peptide,  
10 de, Proteine, Nukleinsäuren, Zucker, Polymere, Botenstoffe, Zellen, Zellfragmente, Viren, deren Bestandteile oder Fragmente dieser Bestandteile, Kapside, deren Bestandteile oder Fragmente dieser Bestandteile und Hormone. Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird das erfindungsgemäße  
15 Verfahren gleichzeitig oder in kurzer Abfolge an einer Anzahl von Gefäßen, insbesondere Kapillaren, durchgeführt.

Besonders gut zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist eine Mikrotiterplatte mit einer Vielzahl  
20 jeweils eine Wand und einen Boden aufweisenden Kavitäten, wobei die Wand für die Bindung der Moleküle aktiviert ist und wobei der Boden nicht für die Bindung zweiter Moleküle aktiviert ist. Eine solche Mikrotiterplatte erlaubt es dem Benutzer, an der Wand jeweils die ihn interessierenden zweiten Moleküle selbst zu immobilisieren.  
25

Die Aktivierung der zweckmäßigerweise aus Kunststoff hergestellten Mikrotiterplatte erfolgt nach herkömmlichen Verfahren. Eine Aktivierung des Bodens der Kavität kann verhindert  
30 werden, indem der Boden z.B. während der Aktivierung abgedeckt wird. Es ist aber auch möglich, den Boden als separates Teil auszuführen und an die bereits aktivierten Wände anzufügen.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal sind an der Wand zweite Moleküle immobilisiert und der Boden weist im wesentlichen keine immobilisierten zweiten Moleküle auf. Dabei können an der Wand jeweils unterschiedliche zweite Moleküle immobilisiert sein. Das erlaubt eine Verfahrensführung mit einem hohen Durchsatz.

Vorteilhafterweise ist die Wand zumindest abschnittsweise aus einem porösen Material hergestellt, wobei das poröse Material aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein kann: Zellulose, Nitrozellulose, Nylon, Agarose, Papier oder Pappe. Der Boden ist zweckmäßigerweise aus einem transparenten oder durchsichtigen Material hergestellt. Das erlaubt eine Messung der Absorption eines Laserstrahls im Durchlichtverfahren. Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal sind dritte oder vierte Moleküle mit der Wand oder den zweiten Molekülen assoziiert.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Kapillaren, an deren Wänden die zweiten Moleküle immobilisiert sind, zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Dabei können sich die Kapillaren, zumindest teilweise, durch unterschiedliche zweite Moleküle unterscheiden. Vorzugsweise unterscheiden sich die Kapillaren mit unterschiedlichen zweiten Molekülen zusätzlich, insbesondere durch deren Abmessungen oder Markierungen. Die Markierungen können aus weiteren Molekülen oder, insbesondere fluoreszierenden, Farbstoffen bestehen. Dadurch ist es möglich, Kapillaren zu identifizieren, an deren Wänden bestimmte zweite Moleküle immobilisiert sind. Es ist ferner möglich, daß die dritten oder vierten Moleküle mit der Wand assoziiert sind.

Nachfolgend wird die Erfindung durch die Zeichnung und anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Es zeigen



Fig. 1a, 1b eine schematische Darstellung des Durchstrahlens eines eine Lösung enthaltenen Gefäßes mit ersten Molekülen und immobilisierten zweiten Molekülen,

5

Fig. 2a, 2b, 2c eine schematische Darstellung des Durchstrahlens eines eine Lösung enthaltenen Gefäßes mit zweiten, vierten und ersten oder fünften Molekülen,

10

Fig. 3a, 3b eine schematische Darstellung des Durchstrahlens eines eine Lösung enthaltenen Gefäßes mit ersten, zweiten und dritten Molekülen,

15

Fig. 4 ein Diagramm des Zeitverlaufs der in Vertiefungen eines 8-Well-Streifens detektierten Fluoreszenz Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide,

20

Fig. 5a, b, c eine schematische Darstellung eines eine Lösung enthaltenden Gefäßes mit ersten Molekülen und immobilisierten zweiten Molekülen und

25

Fig. 6a, b, c eine schematische Darstellung eines eine Lösung enthaltenden Gefäßes mit ersten Molekülen, immobilisierten zweiten Molekülen und dritten Molekülen.

30

Fig. 1a zeigt einen Ausschnitt aus einem Gefäß 10 mit einem ersten Ende 12 und einem zweiten Ende 14. In dem Gefäß 10 befindet sich eine Lösung, welche die ersten Moleküle 16 ent-

hält. An der Wand des Gefäßes 10 sind die dazu affinen zweiten Moleküle 18 immobilisiert. Der in das Gefäß 10 an dem ersten Ende 12 eingestrahlte Lichtstrahl 20 wird durch eine Wechselwirkung mit den ersten Molekülen 16, beispielsweise durch Absorption, moduliert. Der am zweiten Ende 14 ausstrahlende Lichtstrahl 22 weist gegenüber dem eingestrahnten Lichtstrahl 20 veränderte Eigenschaften auf. Die Veränderung dieser Eigenschaften ist ein Maß für die Konzentration der ersten Moleküle 16 in der Lösung. Fig. 1b zeigt das in Fig. 1a dargestellte Gefäß 10 nach dem Inkubieren. Die ersten Moleküle 16 sind an die zweiten Moleküle 18 gebunden. Der in das Gefäß 10 eingestrahlte Lichtstrahl 20 wird nicht durch Wechselwirkungen mit den ersten Molekülen 16 moduliert. Im Falle lichtabsorbierender erster Moleküle 16 ist der ausstrahlende Lichtstrahl 22 nur durch die Lichtabsorption der Lösung, nicht aber wie in Fig. 1a durch die Lichtabsorption der ersten Moleküle 16 abgeschwächt.

In Fig. 2a ist ein Ausschnitt aus einem Gefäß 10 mit daran gebundenen zweiten Molekülen 18 dargestellt. Die in dem Gefäß 10 enthaltene Lösung enthält erste Moleküle 16 und vierte Moleküle 24, die beide eine Affinität zu den zweiten Molekülen 18 aufweisen. Der eingestrahlte Lichtstrahl 20 wird hier durch eine Wechselwirkung mit den vierten Molekülen 24, nicht aber mit den ersten Molekülen 16 moduliert. Die Wechselwirkung kann dadurch bedingt sein, daß die vierten Moleküle 24 lichtabsorbierend sind. Der ausstrahlende Lichtstrahl 22 weist gegenüber dem einstrahlenden Lichtstrahl 20 veränderte Eigenschaften auf. Fig. 2b zeigt die Situation nach dem Inkubieren. Die ersten Moleküle 16 sind an die zweiten Moleküle 18 gebunden. Sie verhindern das Binden der vierten Moleküle 24 an die zweiten Moleküle 18. Die Konzentration der vierten Moleküle 24 in der Lösung ist unverändert. Die Eigenschaften

des ausstrahlenden Lichtstrahls 22 sind gegenüber der in Fig. 2a dargestellten Situation nicht verändert. Das zeigt eine Bindung der ersten Moleküle 16 an die zweite Moleküle 18 an. Fig. 2c zeigt die Situation nach dem Inkubieren, wenn in der Lösung zuvor statt der ersten Moleküle 16 fünfte Moleküle 26 enthalten waren, die keine Affinität zu den zweiten Molekülen 18 aufweisen. Die vierten Moleküle 24 binden dann während des Inkubierens an die zweiten Moleküle 18. Nach dem Inkubieren wird der eingestrahlte Lichtstrahl 20 nicht durch eine Wechselwirkung mit den vierten Molekülen 24 moduliert. Im Falle lichtabsorbierender vierter Moleküle 24 ist die Intensität des ausstrahlenden Lichtstrahls 22 stärker als zu Beginn der Inkubation.

Fig. 3a zeigt einen Ausschnitt aus einem Gefäß 10. In dem Gefäß 10 ist eine Lösung mit ersten Molekülen 16 und dazu affinen dritten Molekülen 23 enthalten. An der Wand des Gefäßes 10 sind zweite Moleküle 18 immobilisiert. Sie weisen eine Affinität zu den ersten Molekülen 16 auf. Der in das Gefäß 10 an dem ersten Ende 12 eingestrahlte Lichtstrahl 20 wird durch eine Wechselwirkung mit den dritten Molekülen 23, beispielsweise durch Absorption, moduliert. Der ausstrahlende Lichtstrahl 22 weist gegenüber dem einstrahlenden Lichtstrahl 20 veränderte Eigenschaften auf. Fig. 3b zeigt die Situation nach dem Inkubieren. Die ersten Moleküle 16 sind an die zweiten Moleküle 18 und die dritten Moleküle 23 gebunden. Die Bindungsstellen der zweiten 18 und dritten Moleküle 23 an den ersten Molekülen 16 sind nicht identisch. Die dritten Moleküle 23 sind der Lösung entzogen. Der in das Gefäß 10 eingestrahlte Lichtstrahl 20 wird nicht mehr durch Wechselwirkungen mit den dritten Molekülen 23 moduliert.

Fig. 4 zeigt den Zeitverlauf der in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen eines 8-Well-Streifens (Boehringer Mannheim, Nr. 1664778) detektierten Fluoreszenz Fluoreszenz-markierter Oligonukleotide I. Eine Vertiefung I des 8-Well-Streifens ist mit einem am 5'-Terminus biotinylierten Oligonukleotid II der Sequenz 5'-TAA CAC AAC TGG TGT GCT CCT GGA-3' gemäß Sequenzprotokoll Nr. 1 beschichtet worden. Dazu sind in die Vertiefung I 300 µl einer Puffer-Lösung I mit 167 nM des Oligonukleotids II eingefüllt worden. Die Puffer-Lösung I besteht aus einer wässrigen Lösung von 10 mM TrisCl und 1 mM EDTA, pH 8,0. Eine Vertiefung II des 8-Well-Streifens ist nur mit 300 µl Puffer-Lösung I gefüllt worden. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C sind die Puffer-Lösungen I aus den Vertiefungen I und II abgesaugt worden. Die Vertiefungen I und II sind 5 mal mit 320 µl der Puffer-Lösung I gewaschen worden. Anschließend sind in die Vertiefungen I und II je 300 µl einer Puffer-Lösung II mit 167 nM des am 5'-Terminus mit 5[6]-Carboxytetramethylrhodamin Fluoreszenz-markierten Oligonukleotids I der Sequenz 5'-GAG CTA GGA CCT CTT CTG TCC AGG AGC ACA CCA GTT GTG TTA-3' gemäß Sequenzprotokoll Nr. 2 eingefüllt worden. Die Puffer-Lösung II besteht aus einer wässrigen Lösung von 150 mM NaCl, 10 mM TrisCl, 1 mM EDTA und 0,2 % Tween-20, pH 8,0. Bei einer Anregung mit 540 nm ist die Fluoreszenz in den Vertiefungen I und II bei 590 nm gemessen worden. Das Messen erfolgte in 25 Sekunden-Intervallen bei Raumtemperatur mittels eines Mikrotiterplattenphotometers. In Fig. 4 ist die Fluoreszenz in willkürlichen Einheiten dargestellt. Die dickere Linie zeigt die in Vertiefung I und die dünnere Linie die in Vertiefung II gemessene Fluoreszenz. Die Abnahme der Fluoreszenz in Vertiefung II zeigt die unspezifische Bindung des Oligonukleotids I an der Wand der Vertiefung II an. Die Differenz zwischen der Abnahme der Fluoreszenz in Vertiefung II und der Abnahme der Fluoreszenz in Vertiefung I

zeigt die spezifische Bindung des Oligonukleotids I an das Oligonukleotid II an.

In den Fig. 5a bis c ist schematisch die Funktion eines Verfahrens zum Nachweisen und/oder Quantifizieren der katalytischen Aktivität erster Moleküle zu dazu affinen zweiten Molekülen gezeigt. Als erste Moleküle 16 werden hier Enzyme verwendet. An der Wand, nicht jedoch am Boden, des Gefäßes 10 sind zweite Moleküle 18 gebunden. Im vorliegenden Fall kann es sich dabei um Peptide, Nukleinsäuren, Zucker, Lipide und ähnliche Stoffe handeln, welche ein Substrat für das Enzym bilden. Die zweiten Moleküle 18 sind vorteilhafterweise mit einem Fluorophor markiert. Der Strahlengang des das Gefäß 10 durchstrahlenden Lichtstrahls (hier nicht gezeigt) verläuft parallel zu den Wänden. Er erfaßt nicht den Bereich der zweiten Moleküle 18.

Fig. 5b zeigt das Gefäß 10 nach Zugabe der nachzuweisenden ersten Moleküle 16. Als erste Moleküle 16 können hier beispielsweise Enzyme, wie Proteasen, Nukleasen, Zuckerabbauende Enzyme, Lipasen oder andere Enzyme verwendet werden. Die ersten Moleküle können auch Teile von größeren Enzymkomplexen oder Zellen sein. Weiterhin können die ersten Moleküle von Zellen gebildet und/oder sezerniert werden.

Fig. 5c zeigt das Gefäß 10 nach dem Inkubieren. Durch die Aktivität der als erste Moleküle 16 hier beispielsweise verwendeten Enzyme sind von den zweiten Molekülen 18 Fragmente 19a abgespalten worden. Reste 19b verbleiben an der Wand des Gefäßes 10, während die durch die Aktivität der ersten Moleküle 16 gebildeten Fragmente 19a sich gleichmäßig über das Volumen des Gefäßes 10 verteilen. Sie absorbieren Licht des eingestrahnten (hier nicht gezeigten) Lichtstrahls. Durch die Ab-

sorption des Lichts kann die Aktivität der ersten Moleküle 16 nachgewiesen werden.

Die Fig. 6a bis c zeigen schematisch den Verfahrensablauf bei  
5 der Zugabe eines Enzyms als erstes Molekül 16 unter Verwendung eines Kompetitors als dritten Molekül 23. In einem Gefäß 10 sind an den Wänden, nicht jedoch am Boden, zweite Moleküle 18 immobilisiert. Bei den zweiten Molekülen 18 kann es sich beispielsweise um Peptide, Nukleinsäuren, Zucker, Lipide oder  
10 andere Stoffe handeln, welche ein Substrat für das Enzym bilden. Vorteilhafterweise sind die zweiten Moleküle 18 z.B. mit einem Fluorophor markiert. Eine (hier nicht gezeigter) Lichtstrahl durchdringt das Gefäß 10 parallel zu dessen Wänden, wobei der Bereich der zweiten Moleküle 18 nicht vom Licht be-  
15 aufschlägt wird. Alternativ zum Lichtstrahl kann auch die Fluoreszenz in einem zentralen Bereich des Gefäßes 10 beobachtet werden.

Fig. 6b zeigt das Gefäß 10 nach Zugabe der ersten Moleküle  
20 16. Im Gefäß befinden sich dritte Moleküle 23. Im vorliegenden Beispiel werden als erste Moleküle 16 Kompetitoren und als dritte Moleküle 23 Proteasen verwendet. Als dritte Moleküle 23 kommen aber auch Nukleasen, Zucker-abbauende Enzyme, Lipasen oder andere Enzyme in Betracht. Als erste Moleküle 16  
25 kommen auch Inhibitoren, Enhancer, Induktoren und dgl. in Betracht.

Fig. 6c zeigt das Gefäß 10 nach dem Inkubieren der nachzuweisenden ersten Moleküle 16 mit den dritten Molekülen 23 sowie  
30 den immobilisierten zweiten Molekülen 18. Durch die Aktivität der als erste Moleküle 16 benutzten Kompetitoren ist die Aktivität der dritten Moleküle 23, hier Proteasen, spezifisch verändert worden. Sofern es sich bei den ersten Molekülen 16

um Inhibitoren der dritten Moleküle 23 handelt, wird der Abbau der zweiten Moleküle 18 spezifisch inhibiert. Die Inhibierung kann anhand der im Gefäß 10 gebildeten Fragmente 19a detektiert werden. Eine verringerte Zunahme an gebildeten  
5 Fragmenten 19a im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Zugabe erster Moleküle 16 zeigt die Anwesenheit der ersten Moleküle 16 in dem Gefäß 10 an.

## Bezugszeichenliste

	10	Gefäß,
	12	erstes Ende,
5	14	zweites Ende,
	16	erste Moleküle,
	18	zweite Moleküle,
	19a	Fragment,
	19b	Rest,
10	20	eingestrahelter Lichtstrahl,
	22	ausstrahlender Lichtstrahl,
	23	dritte Moleküle,
	24	vierte Moleküle,
	26	fünfte Moleküle



## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des Bindens erster Moleküle (16) an dazu affine zweite Moleküle (18) mit folgenden Schritten:

a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle (18) an einer Wand immobilisiert sind,

b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung,

c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) an die zweiten Moleküle (18) binden und sich an der Wand anreichern und

d) Detektieren der Konzentrationsänderung der ersten Moleküle (16) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne Lösung aus dem Gefäß zu entnehmen.

2. Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des Bindens erster Moleküle (16) an dazu affine zweite Moleküle (18) mit folgenden Schritten:

a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle (18) an einer Wand immobilisiert sind,

b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung, wobei dritte Moleküle (23) mit einer Affinität zu den ersten Molekülen (16) in der Lösung oder in dem Gefäß (10) enthalten sind,

c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) an die zweiten (18) und dritten Moleküle (23) binden und sich an der Wand anreichern und

5 d) Detektieren der Konzentrationsänderung der dritten Moleküle (23) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne Lösung aus dem Gefäß zu entnehmen.

10 3. Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des Bindens erster Moleküle (16) an dazu affine zweite Moleküle (18) mit folgenden Schritten:

a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle (18) an einer Wand immobilisiert sind,

15 b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung, wobei vierte Moleküle (24) mit einer Affinität zu den zweiten Molekülen (18) in der Lösung oder in dem Gefäß (10) enthalten sind,

20 c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) an die zweiten Moleküle (18) binden und die vierten Moleküle (24), zumindest teilweise, in Lösung gehen oder bleiben und

25 d) Detektieren der Konzentrationsänderung der vierten Moleküle (24) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne Lösung aus dem Gefäß zu entnehmen.

30 4. Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren der enzymatischen oder chemischen Aktivität erster Moleküle (16) zu dazu affinen zweiten Molekülen (18) mit folgenden Schritten:

- a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle (18) an einer Wand immobilisiert sind,
- b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die  
5 ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung,
- c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) die zweiten Moleküle (18) unter Freisetzung eines Frag-  
ments (19a) der zweiten Moleküle (18) umsetzen und  
10
- d) Detektieren der Konzentrationsänderung des Fragments (19a) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne Lösung aus dem Gefäß zu entnehmen.
- 15 5. Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren der enzymatischen oder chemischen Aktivität erster Moleküle (16) zu dazu affinen zweiten (18) oder dritten Molekülen mit folgenden Schritten:
- 20 a) Vorsehen eines Gefäßes (10), in dem die zweiten Moleküle (18) an einer Wand immobilisiert sind,
- b) Inkontaktbringen der zweiten Moleküle (18) mit einer die ersten Moleküle (16) enthaltenden Lösung, wobei in der Lösung  
25 dritte Moleküle mit einer Affinität zu den zweiten Molekülen enthalten sind,
- c) Inkubieren des Gefäßes (10), so daß die ersten Moleküle (16) an die zweiten (18) oder dritten Moleküle binden und da-  
30 durch eine die Freisetzung eines Fragments (19a) der zweiten Moleküle (18) bewirkende Umsetzung durch die dritten Moleküle unterdrückt oder verstärkt wird und

- d) Detektieren der Konzentrationsänderung des Fragments (19a) in der im Gefäß (10) enthaltenen Lösung mittels Strahlung, ohne Lösung aus dem Gefäß (10) zu entnehmen.
- 5 6. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die in dem Gefäß (10) enthaltenen dritten (23) oder vierten Moleküle (24) mit den zweiten Molekülen (18) oder der Wand assoziiert sind.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Affinität der vierten Moleküle (24) zu den zweiten Molekülen (18) nicht oder nicht wesentlich größer ist als die Affinität der ersten Moleküle (16) zu den zweiten Molekülen (18).
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Anzahl der ersten Moleküle (16) größer ist als die Anzahl der zweiten Moleküle (18) und die Anzahl der zweiten Moleküle (18) größer ist als die Anzahl der vierten Moleküle (24).
- 20 9. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Anzahl der zweiten Moleküle (18) größer ist als die Anzahl der ersten Moleküle (16).
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Anzahl der ersten Moleküle (16) nicht kleiner ist als die Anzahl der dritten Moleküle (23).
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das erste Molekül (16) ein spaltendes Enzym, vorzugsweise eine Protease, Peptidase, Nuklease, Helicase oder Lipase, oder ein Zucker-abbauendes Enzym ist.
12. Verfahren nach Anspruch 4 oder 11, wobei das zweite Molekül (18) ein, vorzugsweise aus einem Protein, Peptid, einer

Nukleinsäure, Helicase oder einem monomeren oder polymeren Zucker gebildetes, Substrat für das erste Molekül (16) bildet.

- 5 13. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das dritte Molekül ein spaltendes Enzym, vorzugsweise eine Protease, Peptidase, Nuklease, Helicase oder Lipase, oder ein Zucker-abbauendes Enzym ist.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das zweite Molekül (18) ein, vorzugsweise aus einem Protein, Peptid, einer Nukleinsäure, Helicase oder einem monomeren oder polymeren Zucker gebildetes, Substrat für das dritte Molekül bildet.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das erste Molekül (16) in bezug zum dritten Molekül ein Agonist, ein Antagonist oder ein Kompetitor ist.
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 5, wobei durch die Bindung des zweiten Moleküls an das erste Molekül eine Spaltung des zweiten Moleküls durch das dritte Molekül verhindert wird.
- 25 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Detektieren mit einem Lichtstrahl (20), insbesondere einer definierten Wellenlänge, vorzugsweise einem Laserstrahl, in die Lösung eingestrahlt wird.
- 30 18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei der Lichtstrahl (20) parallel zu der Wand eingestrahlt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei der Lichtstrahl (20) polarisiert ist.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum Detektieren eine Fluoreszenz, eine Streuung, eine Absorption oder eine optische Aktivität gemessen wird.

5 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in der Lösung zusätzlich fünfte, als interne Marker dienende Moleküle (26) enthalten sind, die keine spezifische Affinität zu den ersten (16), zweiten (18), dritten (23) oder vierten Molekülen (24) aufweisen.

10 22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ersten (16), dritten (23), vierten (24) und/oder fünften Moleküle (26) oder Fragmente dieser Moleküle oder damit assoziiierende Bestandteile fluoreszierend, lichtstreuend, lichtabsorbierend oder optisch aktiv sind.

15 23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Durchführung des Schritts lit. d durch mehrfaches oder kontinuierliches Bestimmen der Konzentration der ersten (16),  
20 dritten (23) oder vierten Moleküle (24) während der Durchführung des Schritts lit. c, insbesondere an deren Beginn und Ende, erfolgt.

25 24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei freie Bindungsstellen an der Wand des Gefäßes (10) durch daran gebundene sechste Moleküle abgesättigt sind.

30 25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung mindestens einen eine unspezifische Bindung inhibierenden Zusatz, insbesondere ein Detergenz, ein Protein, ein Proteingemisch oder ein Salz, enthält.

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Ermittlung einer spezifischen Konzentrationsänderung von dem Betrag der Konzentrationsänderung gemäß Schritt lit. d der Betrag einer Konzentrationsänderung bei Durchführung des Verfahrens ohne zweite Moleküle abgezogen wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gefäß (10) als Kavität einer Mikrotiterplatte mit mindestens 96, insbesondere 384, Kavitäten ausgebildet ist.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gefäß (10) an der Ein- und/oder Austrittsstelle des Lichtstrahls (20, 22), vorzugsweise dem Boden des Gefäßes (10), im wesentlichen keine immobilisierten zweiten Moleküle (18) aufweist.

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Gefäß (10) eine an den Enden (12, 14) offene Kapillare ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Kapillare mittels Kapillarkräften mit der Lösung gefüllt wird.

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Quotient aus der Fläche der Wand in  $\text{mm}^2$  und dem Volumen der Lösung in  $\text{mm}^3$  größer als  $1 \text{ mm}^{-1}$ , vorzugsweise größer als  $3 \text{ mm}^{-1}$ , ist.

32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ersten (16), zweiten (18), dritten (23), vierten (24), fünften (26) oder sechsten Moleküle aus folgender Gruppe ausgewählt sind: Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Zucker, Polymere, Botenstoffe, Zellen, Zellfragmente, Viren, deren Be-

standteile oder Fragmente dieser Bestandteile, Kapside, deren Bestandteile oder Fragmente dieser Bestandteile und Hormone.

5 33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verfahren gleichzeitig oder in kurzer Abfolge an einer Anzahl von Gefäßen (10), insbesondere Kapillaren, durchgeführt wird.

10 34. Mikrotiterplatte zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 33 mit einer Vielzahl jeweils eine Wand und einen Boden aufweisenden Kavitäten, wobei die Wand für die Bindung zweiter Moleküle (18) aktiviert ist,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 der Boden nicht für die Bindung zweiter Moleküle (18) aktiviert ist.

20 35. Mikrotiterplatte nach Anspruch 34, wobei an der Wand zweite Moleküle (18) immobilisiert sind und der Boden im wesentlichen keine immobilisieren zweiten Moleküle (18) aufweist.

25 36. Mikrotiterplatte nach Anspruch 35 oder 36, wobei die Wand zumindest abschnittsweise aus einem porösen Material hergestellt ist.

30 37. Mikrotiterplatte nach Anspruch 37, wobei das poröse Material aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Zellulose, Nitrozellulose, Nylon, Agarose, Papier, Pappe.



38. Mikrotiterplatte nach einem der Ansprüche 35 bis 38, wobei der Boden aus einem transparenten oder durchsichtigen Material hergestellt ist.

5 39. Mikrotiterplatte nach Anspruch 35 bis 39, wobei dritte (23) oder vierte Moleküle (24) mit der Wand oder den zweiten Molekülen (18) assoziiert sind.

10 40. Verwendung von Kapillaren, an deren Wand zweite Moleküle (18) immobilisiert sind, zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 33.

15 41. Verwendung nach Anspruch 41, wobei sich die Kapillaren eine die Art der zweiten Moleküle (18) anzeigende Markierung aufweisen.

42. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dritten (23) oder vierten Moleküle (24) mit der Wand oder den zweiten Molekülen (18) assoziiert sind.

20

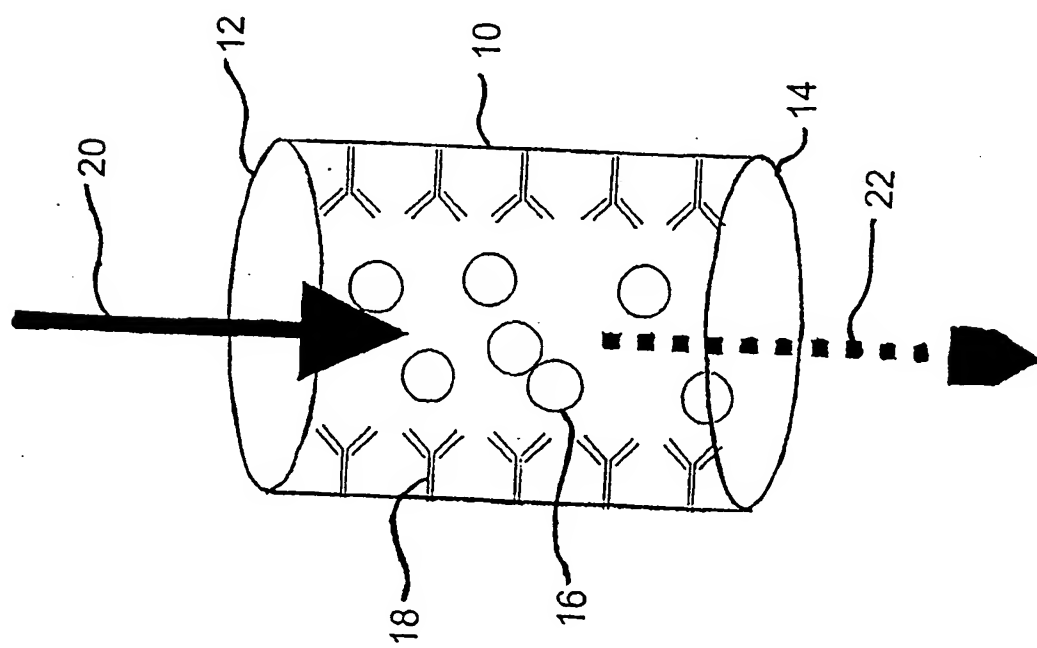


Fig. 1a

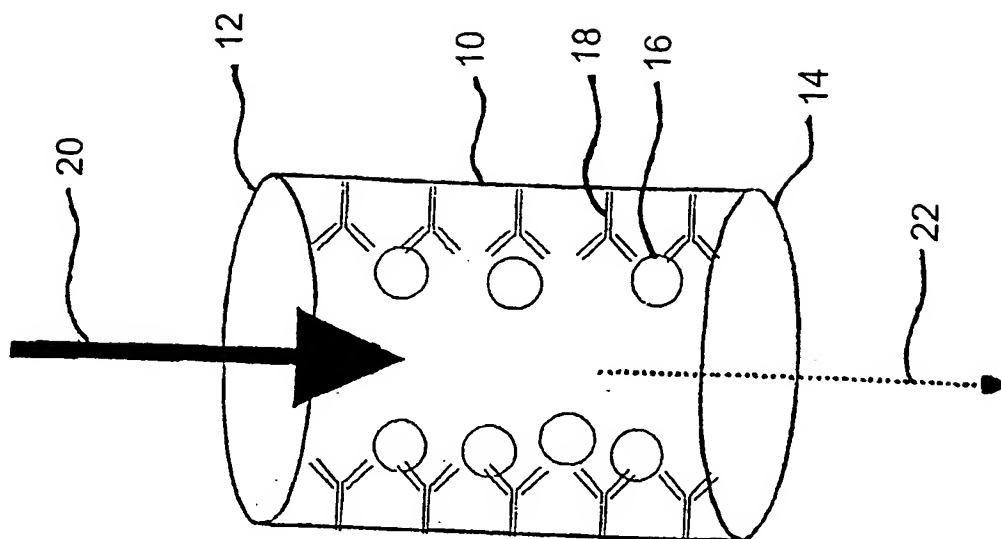
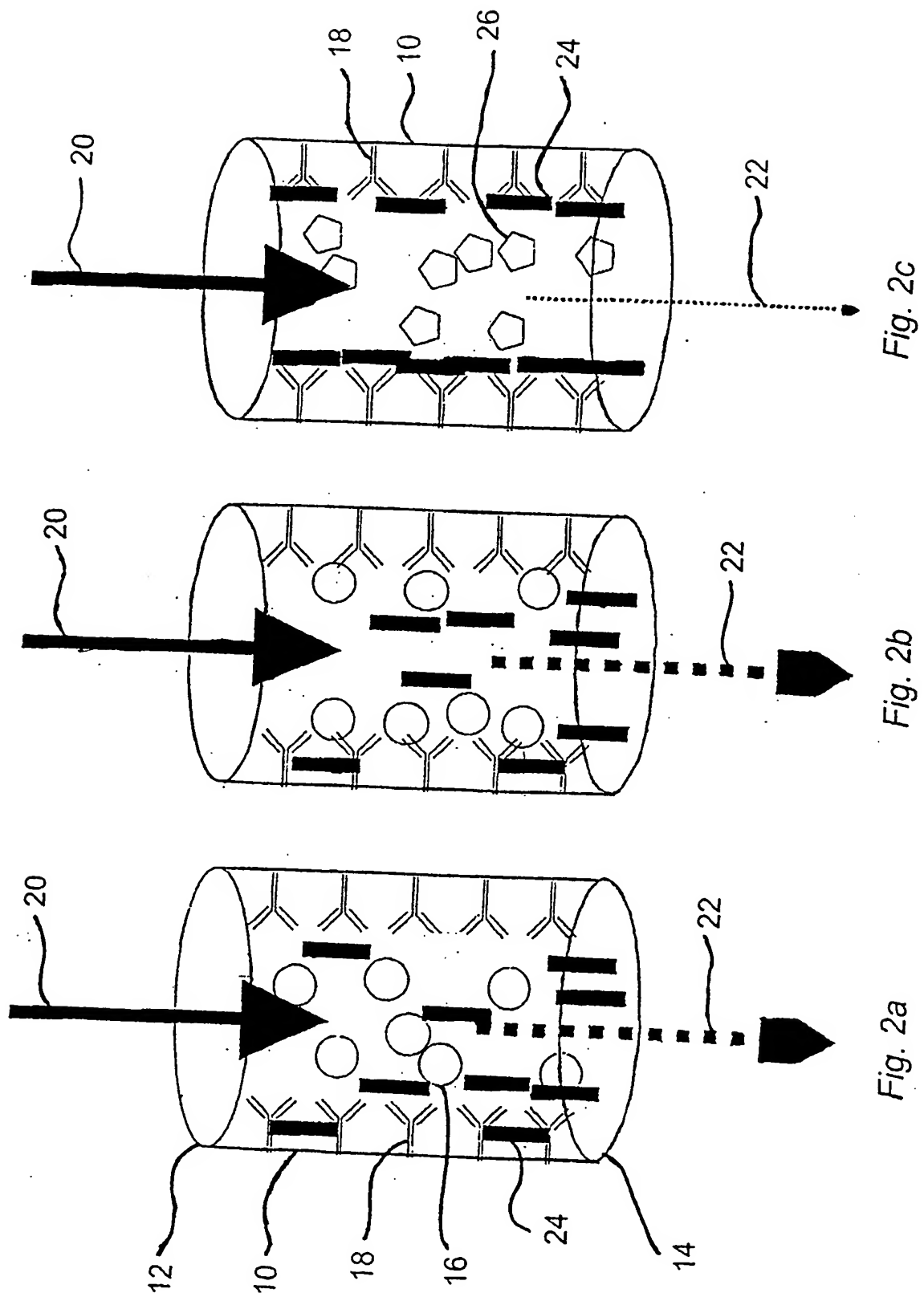


Fig. 1b

2/6



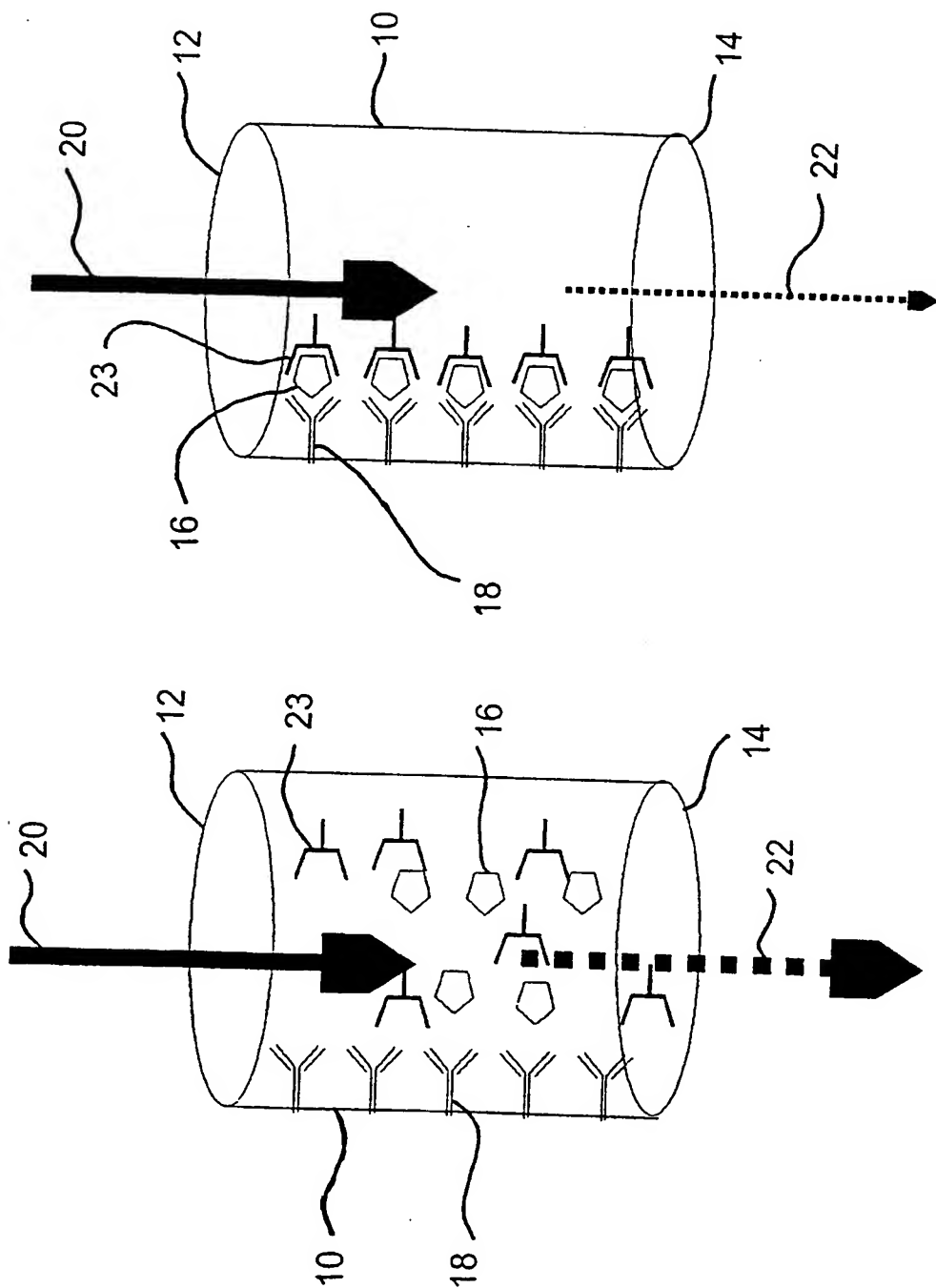


Fig. 3b

Fig. 3a

4/6

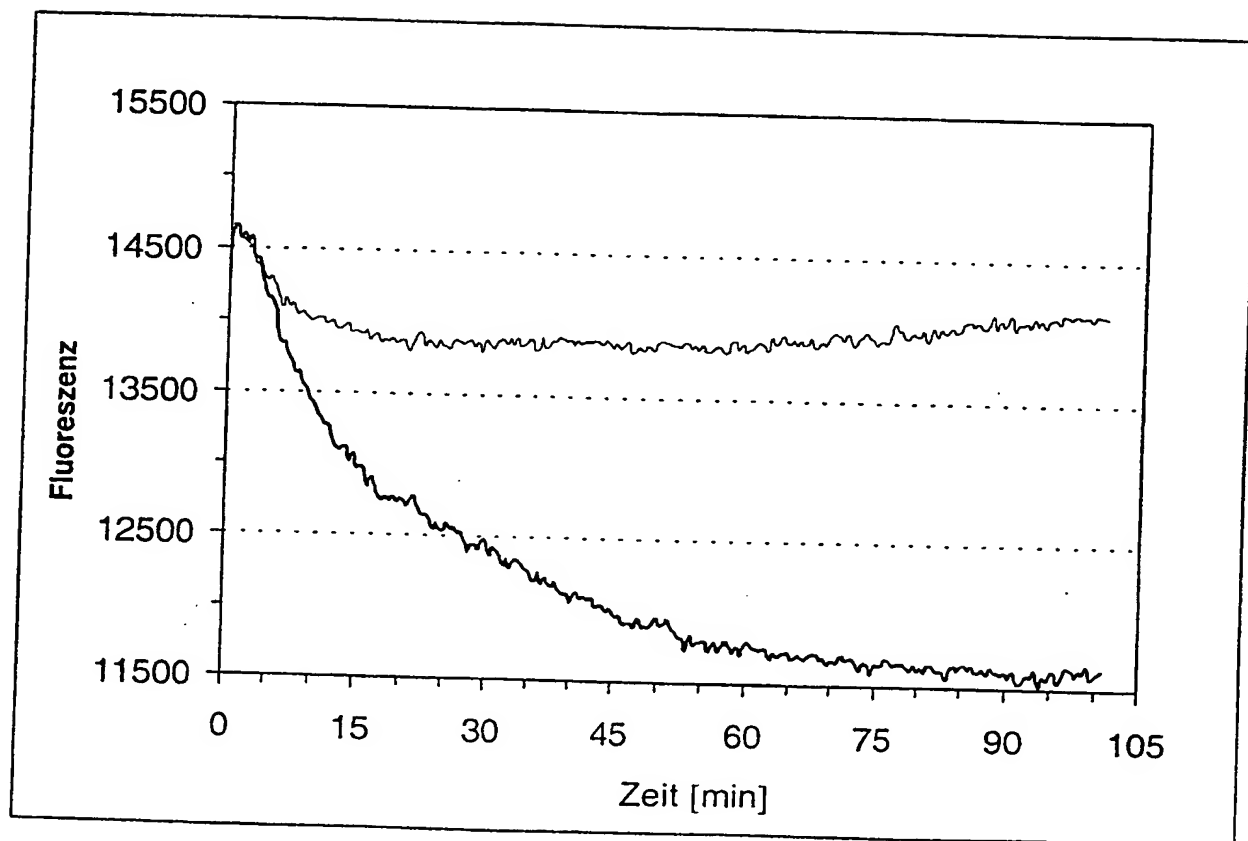


Fig. 4

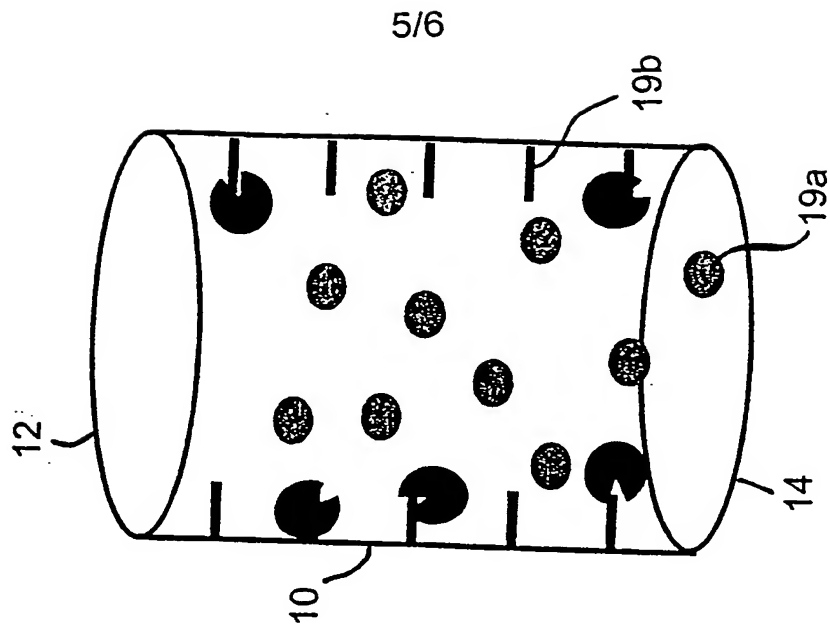


Fig. 5c

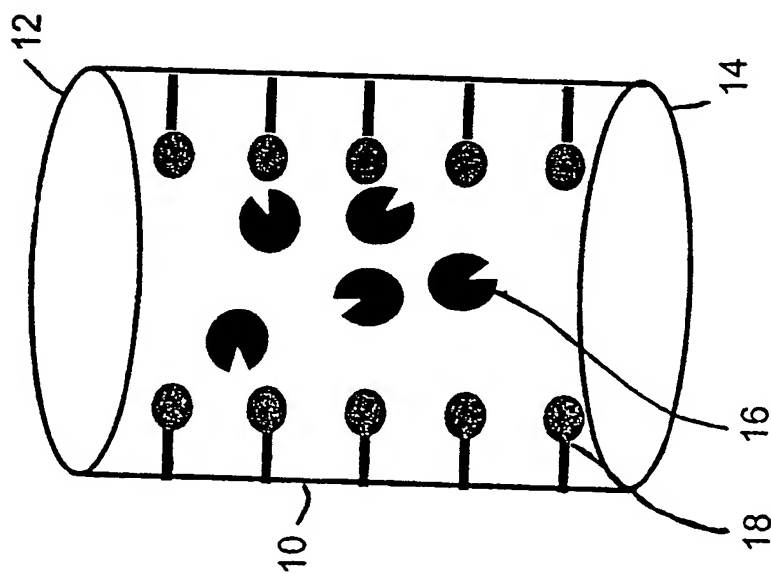


Fig. 5b

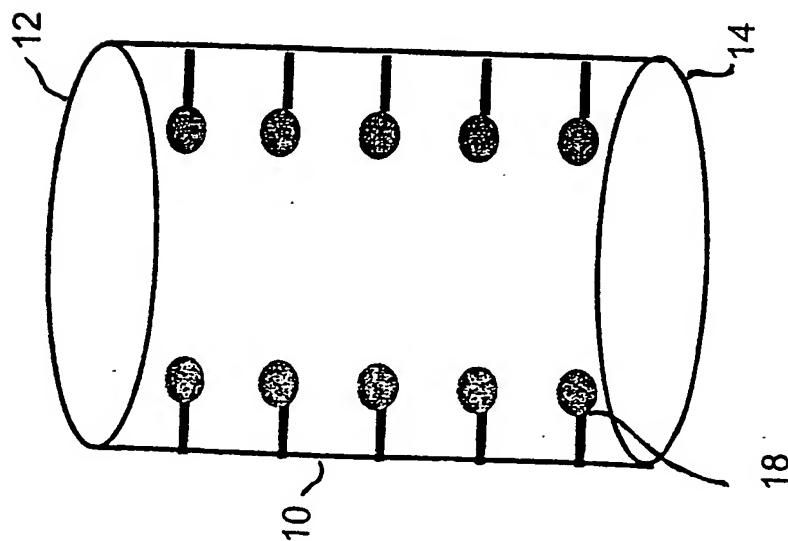


Fig. 5a

6/6

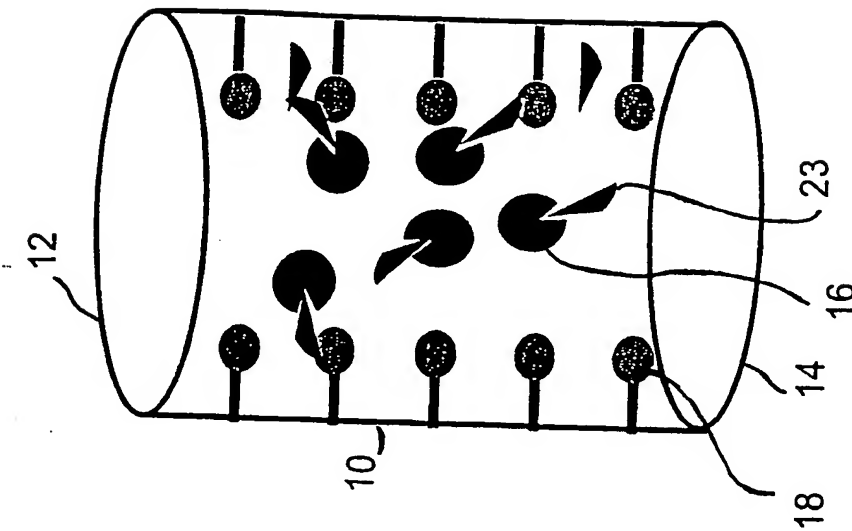


Fig. 6c

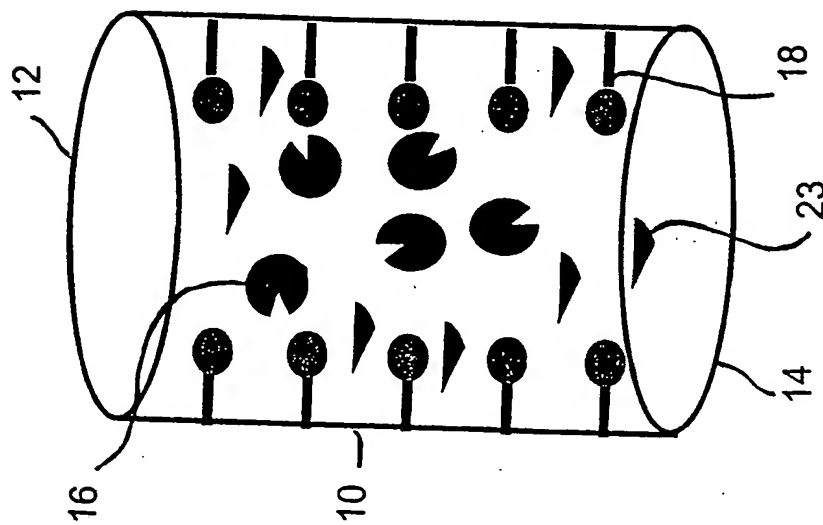


Fig. 6b

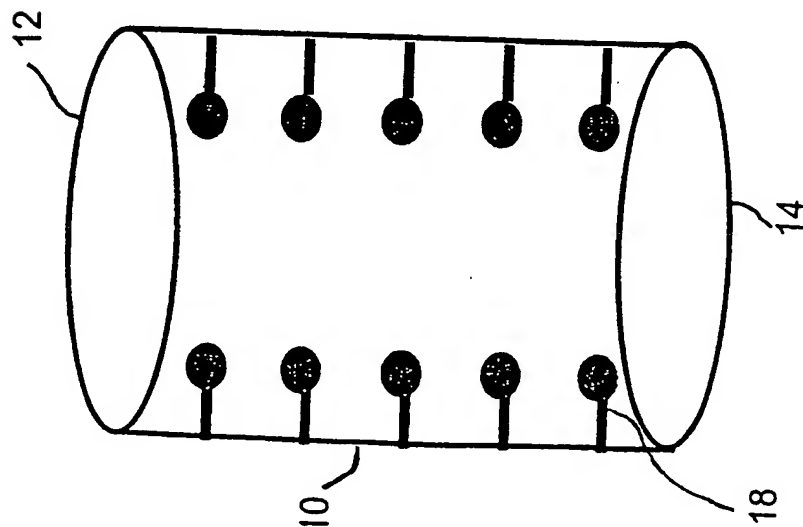


Fig. 6a

ERSÄTZBLATT (REGEL 26)

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> november Aktiengesellschaft Gesellschaft für Molekulare Medizin

10 <120> Verfahren zum Nachweisen und/oder Quantifizieren des  
Bindens erster Moleküle

15 <130> 411674GA  
<140>  
<141>

20 <160> 2  
<170> PatentIn Ver. 2.1

25 <210> 1  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Willkürlich  
gewählte Sequenz

<400> 1  
taacacaact ggtgtgctcc tgga 24

35 <210> 2  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Willkürlich  
gewählte Sequenz

45 <400> 2  
gagctaggac ctcttctgtc caggagcaca ccagttgtgt ta 42